

10.04.98

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1997年 3月21日

REC'D 09 JUN 1998

WIPO

PCT

出 願 番 号
Application Number:

平成 9年特許願第068467号

出 願 人
Applicant(s):

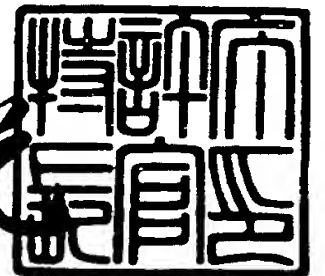
中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 5月22日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平10-3038189

【書類名】 特許願
【整理番号】 973153
【提出日】 平成 9年 3月21日
【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿
【国際特許分類】 A61K 39/395
【発明の名称】 I L-6 アンタゴニストを有効成分として含有する感作
T細胞関与疾患の予防・治療剤
【請求項の数】 12

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1-135 中外製薬株式会社内

【氏名】 三原 昌彦

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代表者】 永山 治

【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100088269

【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9207941

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する感作T細胞
関与疾患の予防・治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤。

【請求項2】 IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体であることを特徴とする請求項1記載の予防または治療剤。

【請求項3】 IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項2に記載の予防または治療剤。

【請求項4】 IL-6アンタゴニストがヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項3に記載の予防または治療剤。

【請求項5】 IL-6アンタゴニストがマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項3に記載の予防または治療剤。

【請求項6】 IL-6アンタゴニストがMR16-1抗体であることを特徴とする請求項5に記載の予防または治療剤。

【請求項7】 IL-6アンタゴニストがPM-1抗体であることを特徴とする請求項4に記載の予防または治療剤。

【請求項8】 IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対するキメラ抗体またはヒト型化抗体であることを特徴とする請求項3に記載の予防または治療剤。

【請求項9】 IL-6アンタゴニストがヒト型化PM-1抗体であることを特徴とする請求項8に記載の予防または治療剤。

【請求項10】 感作T細胞関与疾患が、多発性硬化症、ぶどう膜炎、慢性甲状腺炎、遅延性過敏症、接触性皮膚炎またはアトピー性皮膚炎である、請求項1ないし9に記載の予防または治療剤。

【請求項11】 IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する感作T細胞抑制剤。

【請求項12】 IL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する感作T細胞抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する感作T 細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。また、本発明は、IL-6アンタゴニストを有効成分とする感作T 細胞抑制剤に関する。さらに、本発明はIL-6受容体に対する抗体を有効成分とする感作T 細胞抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

IL-6はB 細胞刺激因子2 (BSF2) あるいはインターフェロン β 2とも呼称されたサイトカインである。IL-6は、B リンパ球系細胞の活性化に関与する分化因子として発見され (Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76)、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかになった (Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78)。IL-6は、T リンパ球系細胞の成熟化を誘導することが報告されている (Lotz et al., J. Exp. Immunol. 18: 1253-1258, 1988)。

【0003】

IL-6は、細胞上で二種の蛋白質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80kDのリガンド結合性蛋白質のIL-6受容体である。IL-6受容体は、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6受容体としても存在する。

もう一つは、非リガンド結合性のシグナル伝達に係わる分子量約130kDの膜蛋白質gp130である。IL-6とIL-6受容体はIL-6/IL-6受容体複合体を形成し、次いでgp130と結合することにより、IL-6の生物学的活性が細胞内に伝達される (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967)。

【0004】

IL-6アンタゴニストは、IL-6の生物学的活性の伝達を阻害する物質であり、これまでに、IL-6に対する抗体 (抗IL-6抗体)、IL-6受容体に対する抗体 (抗IL-6受容体抗体)、gp130に対する抗体 (抗gp130抗体) が知られている。また、そ

の他に、国際特許出願公開番号W0 95-00852、国際特許出願公開番号W0 95-11303、国際特許出願公開番号W0 96-34104、国際特許出願公開番号W0 96-18648、国際特許出願公開番号W0 96-17869、特開平7-324097、特開平8-311098に開示されたIL-6アンタゴニストが知られている。

【0005】

抗IL-6受容体抗体に関しては、いくつかの報告がある (Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146、Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630、国際特許出願公開番号W0 95-09873、フランス特許出願公開番号FR 2

694767、米国特許番号US 521628)。その一つであるマウス抗体PM-1 (Hirata, et al., J. Immunology (1989) 143, 2900-2906) の相捕性決定領域 (CDR) をヒト抗体へ移植することにより得られたヒト型化PM-1抗体が知られている (国際特許出願公開番号W0 92-19759)。

【0006】

一方、多くの自己免疫疾患やアレルギー疾患において、特定の抗原を認識するT細胞 (感作T細胞) が存在し、この感作T細胞が病態に関与していることが知られている。例えば、多発性硬化症ではミエリン塩基性タンパク (Zhang, J. et al., J. Exp. Med (1994) 179, 973-984)、ぶどう膜炎ではS抗原 (Nussenblatt, R.B. et al., Am. J. Ophthalmol (1980) 89, 173-179)、慢性甲状腺炎ではサイログロブリン、アトピー性皮膚炎では食物、ダニなど (Kubota, Y. et al., J. Dermatol (1993) 20, 85-87, Kondo, N. et al., J. Allergy Clin. Immunol (1993) 91, 658-668)、遅延型過敏症では細菌、ウイルス、カビなど、接触性皮膚炎では金属、漆などを抗原とする感作T細胞の存在が知られている。

【0007】

さらに、これらの抗原を動物に免疫したり、抗原特異的感作T細胞を非免疫動物に移入することによりヒトと類似の病態を誘導することも可能である。このことから、感作T細胞が上記疾患において重要な役割を果たしていると考えられている。現在、これら疾患の治療にはステロイド剤や免疫抑制剤が使用されているが、対症療法であり、しかも長期間の投与が必要とされ、副作用が問題となっている。

これまでに、上記のようなIL-6アンタゴニストが感作T細胞抑制効果を示し、感作T細胞が関与する疾患に対して治療効果を有することは知られていなかった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、前記の欠点を有さない感作T細胞関与疾患の治療剤を提供しようとするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

すなわち、本発明は、IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、IL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、IL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

【0010】

本発明はまた、MR16-1抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、PM-1抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、IL-6受容体に対するキメラ抗体またはヒト型化抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、ヒト型化PM-1抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、上記IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する多発性硬化

症、ぶどう膜炎、慢性甲状腺炎、遅延性過敏症、接触性皮膚炎またはアトピー性皮膚炎の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、IL-6アンタゴニストを有効成分とする感作T細胞抑制剤に関する。

本発明はさらに、IL-6受容体に対する抗体を有効成分とする感作T細胞抑制剤に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

1. IL-6 アンタゴニスト

本発明で使用されるIL-6アンタゴニストは、感作T細胞の抑制効果または、感作T細胞が関与する疾患の予防または治療効果を示すものであれば、その由来、種類および形状を問わない。

IL-6アンタゴニストは、IL-6による情報伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害する物質である。IL-6アンタゴニストとしては、抗IL-6抗体、抗IL-6受容体抗体、抗gp130抗体、IL-6改変体、あるいはIL-6またはIL-6受容体の部分ペプチドが挙げられる。

【0012】

1-1. 抗IL-6抗体

本発明で使用される抗IL-6抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する抗体である。

このような抗体としては、MH166 (Matsuda et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956) やSK2抗体 (Sato, K. et al., 第21回 日本免疫学会総会、学術記録(1991) 21, 166) 等が挙げられる。

【0013】

1-1-1. IL-6 の調製

抗IL-6抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0014】

具体的には、抗IL-6抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6は、Eur. J. Biochem (1987) 168, 543、J. Immunol. (1988) 140, 1534、あるいはArgic. Biol. (1990) 54, 2685に開示されたIL-6遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のIL-6蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

【0015】

1-2. 抗IL-6受容体抗体

本発明で使用される抗IL-6受容体抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6受容体抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6受容体と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する抗体である。

【0016】

このような抗体としては、MR16-1抗体 (Saito, et al., J. Immunol. (1993) 147, 168-173)、PM-1抗体 (Hirata, et al., J. Immunology (1989) 143, 2900-2906)、AUK12-20抗体、AUK64-7抗体あるいはAUK146-15抗体 (国際特許出

願公開番号W0 92-19759) などが挙げられる。これらのうちで、特に好ましい抗体としてPM-1抗体が挙げられる。

なお、PM-1抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、PM-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成2年7月10日に、FERM BP-2998としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。また、MR16-1抗体産生ハイブリドーマ細胞株はRat-mouse hybridoma MR16-1として、平成9年3月13日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5875として寄託された。

【0017】

1-2-1. IL-6 受容体の調製

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6受容体を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0018】

具体的には、抗IL-6受容体抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6受容体は、欧州特許出願公開番号EP 325474 に、マウスIL-6受容体は日本特許出願公開番号特開平3-155795に開示されたIL-6受容体遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6受容体蛋白質は、細胞膜上に発現しているものと細胞膜より離脱しているもの（可溶性IL-6受容体）（Yasukawa, et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676）との二種類がある。可溶性IL-6受容体抗体は細胞膜に結合しているIL-6受容体の実質的に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型IL-6受容体と異なっている。

【0019】

IL-6受容体の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のIL-6受容体蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6受容体を発現している細胞やIL-6受容体蛋白質と他の蛋白質

との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

ヒトIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpIBIBSF2R を含有する大腸菌 (E.coli) は、平成元年 (1989年) 1 月9 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に、HB101-pIBIBSF2R として、受託番号FERM BP-2232としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0020】

1-3. 抗gp130 抗体

本発明で使用される抗gp130 抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗gp130 抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はgp130 と結合することにより、IL-6/IL-6受容体複合体のgp130 への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する抗体である。

このような抗体としては、AM64抗体 (特開平3-219894)、4B11抗体および2H4抗体 (US5571513) B-S12 抗体およびB-P8抗体 (特開平8-291199) などが挙げられる。

【0021】

1-3-1. gp130の調製

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、gp130 を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0022】

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるgp130 は、欧州特許出願公開番号EP 4 11946 に開示されたIL-6受容体遺伝子/アミノ酸配列を用いることによって得ら

れる。

gp130 の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のgp130 蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、gp130 を発現している細胞やgp130 蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

【0023】

1-4. 抗体産生ハイブリドーマの作製

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

【0024】

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (J. Immunol. (1979) 123: 1548-1550)、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8: 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276: 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21)、S194

(Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148: 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277: 131-133) 等が適宜使用される。

【0025】

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール

(PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0026】

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1～10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000～6000程度のPEG溶液を通常、30～60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

【0027】

当該ハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えば、HAT培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが行われる。

【0028】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原蛋白質または抗原発現細胞で感作し、感作Bリンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、所望の抗原または抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878 参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原または抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735 参照）。

【0029】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0030】

例えば、抗IL-6受容体抗体産生ハイブリドーマの作製は、特開平3-139293に開示された方法により行うことができる。工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成2年7月10日に、FERM BP-2998としてブタペスト条約に基づき国際寄託されたPM-1抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウス（日本クレア製）の腹腔内に注入して腹水を得、この腹水からPM-1抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5%BM-Condimed H1（Boehringer Mannheim 製）含有RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM 培地（GIBCO-BRL 製）、PFHM-II 培地（GIBCO-BRL 製）等で培養し、その培養上清からPM-1抗体を精製する方法で行うことができる。

【0031】

1-5. 組換え型抗体

本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, TERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

【0032】

具体的には、目的とする抗体を産生するハイブリドーマから、抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. ら、Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chmczynski, P. ら、(1987) 162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia 製）等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia 製）を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

【0033】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002；Belyavsky, A. ら、Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932）を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

【0034】

目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクタ

一へ組み込んでもよい。

本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

【0035】

1-6. 改変抗体

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体、ヒト型化 (Humanized) 抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 96/02576 参照)。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

【0036】

例えば、キメラPM-1抗体のL鎖およびH鎖のV領域をコードするDNAを含むプラスミドは、各々pPM-k3およびpPM-h1と命名され、このプラスミドを有する大腸菌は、National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limitedに、1991年2月11日に、各々NCIMB 40366、NCIMB40362としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている (国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照)。

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 96/02576 参照)。

【0037】

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (FR; framew

ork region) を連結するように設計したDNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR 法により合成する。得られたDNA をヒト抗体C 領域をコードするDNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号W0 92-19759 参照）。

CDR を介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

【0038】

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C 領域が使用される。ヒト抗体C 領域としては、C γ が挙げられ、例えば、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4 を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C 領域を修飾してもよい。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC 領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域（framework region; FR）およびC 領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化PM-1抗体が挙げられる（国際特許出願公開番号W0 92-19759 参照）。

【0039】

1-7. 発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3' 側下流にポリA シグナルを機能的に結合させたDNA あるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー（

human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

【0040】

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV 40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロゲンゼーションファクター-1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

【0041】

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、W096/30394を参照)。

【0042】

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子

、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitroおよびin vivo の産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0043】

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5 が知られている。植物細胞としては、Nicotiana tabacum 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えばアスペルギウス属 (Aspergillus) 属、例えばアスペルギウス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。

【0044】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、in vivo にて抗体を産生してもよい。

【0045】

一方、in vivo の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができ

る (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。

植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

【0046】

これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入

し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

【0047】

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをAgrobacterium tumefaciensのようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばNicotiana tabacumに感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【0048】

上述のようにin vitroまたはin vivoの産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖(H鎖)または軽鎖(L鎖)をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい(国際特許出願公開番号WO 94-11523 参照)。

【0049】

1-8. 抗体修飾物

本発明で使用する抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv またはH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A. H. ~~Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.~~

、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照)。

【0050】

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリンカーを介して連結される (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12～19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

【0051】

scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖または、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖または、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

また、一旦scFvをコードするDNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ること

ができ、また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

【0052】

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に

化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

【0053】

1-9. 抗体の分離・精製

1-9-1. 抗体の分離・精製

前記のように発現・産生された抗体は、宿主細胞内外から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインA カラム、プロテインG カラムが挙げられる。プロテインA カラムに用いる担体として、例えば、Hyper D、PORO S、Sephacrose F.F.等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用する抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。

【0054】

1-9-2. 抗体の濃度測定

上記2-1 で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定またはELISA 等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、をPBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出する。また、

ELISA による場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M 重炭酸緩衝液 (pH9.6) で1 $\mu\text{g/ml}$ に希釈したヤギ抗ヒトIgG (TAGO製) 100 μl を96穴プレート (Nunc製) に加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固層化する。

【0055】

ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用する抗体または抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL製) 100 μl を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100 μl を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nm での吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

【0056】

1-10. 抗体以外のIL-6アンタゴニスト

抗体以外の本発明で使用するIL-6アンタゴニストであるIL-6改変体としては、Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93、あるいはSavino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367 に開示されたものが挙げられる。

IL-6改変体は、IL-6のアミノ酸配列中に変異を導入して、IL-6受容体との結合活性を維持したまま、IL-6活性の伝達作用がないものが好ましい。さらにその由来となるIL-6は上記の性質を有する限り、その動物種を問わないが、抗原性を考慮すればヒト由来のものを使用するのが好ましい。

【0057】

具体的には、IL-6のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、たとえば、WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56) を用いてその二次構造を予測し、さらに置換されるアミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。適当な置換アミノ酸残基を決定した後、ヒトIL-6遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われるPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法により変異を導入することにより、IL-6改変体をコードする遺伝子が得られる。これを必要に応じて適当な発現ベクターに組

み込み、大腸菌細胞や哺乳類細胞で発現させ、培養上清中に含まれたまま、あるいは通常の手法により、これを単離精製し、IL-6受容体に対する結合活性およびIL-6の中和活性を評価することができる。

【0058】

本発明で使用されるIL-6部分ペプチドあるいはIL-6受容体部分ペプチドは、各々IL-6受容体あるいはIL-6に結合し、IL-6の活性伝達作用がないものであれば、その配列を問わない。IL-6部分ペプチドおよびIL-6受容体部分ペプチドについては、特開平7-324097、特開平8-311098および米国特許公報US 5210075を参照のこと。

これらのIL-6アンタゴニストは、公知の技術、例えば、上記の抗体産生と同様の技術を用いて製造することができる。

【0059】

2. IL-6アンタゴニストの活性の確認

本発明で使用されるIL-6アンタゴニストの活性の評価は、通常知られた方法を使用することができる。例えば、IL-6依存性細胞MH60.BSF2 にIL-6を添加し、IL-6アンタゴニストを共存させることによりIL-6依存性細胞の³H-チミジン取込みを指標として評価すればよい。また、IL-6受容体発現細胞であるU266に対し¹²⁵I標識IL-6と過剰量の非標識IL-6を添加し、同時にIL-6アンタゴニストを加え、IL-6受容体発現細胞に結合した¹²⁵I標識IL-6を測定することにより、評価すればよい。

【0060】

3. 治療効果の確認

本発明により達成される効果を確認するには、本発明で使用されるIL-6アンタゴニストを、抗原投与などでT細胞が感作された状態の動物や感作T細胞を移入した動物に投与し、感作T細胞の抑制効果を評価することにより行うことができる。

動物に投与される感作抗原としては、例えば、結核菌を用いることができる。

また、免疫される動物としては、通常実験に用いられる動物でよく、例えば、マウス、ラット、ウサギなどを用いることができる。評価する本発明の効果の確

認は、抗原免疫した動物に同一の抗原をチャレンジすることにより誘導される遅延型の炎症反応を観察することにより行うことができる。

【0061】

後述の実施例に示されるように、抗IL-6受容体抗体の投与により、マウス遅延型足せき浮腫反応において、遅延型炎症反応の抑制が認められた。遅延型足せき浮腫反応には感作T細胞が関与していることが知られていることから、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストは感作T細胞に対して抑制効果を有することが示された。

【0062】

4. 投与経路および製剤

本発明の感作T細胞関与疾患の予防または治療剤は、非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1 kgあたり0.01 mgから100 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1 ~1000 mg、好ましくは5 ~50 mgの投与量を選ぶことができる。

【0063】

本発明の感作T細胞関与疾患の予防または治療剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。

【0064】

使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

本発明の予防または治療対象疾患は、感作T細胞が関与する疾患である。具体的には、遅延性過敏症、慢性甲状腺炎、ぶどう膜炎、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎または多発性硬化症等が挙げられる。本発明の予防または治療剤は、これら感作T細胞が関与する疾患の予防または治療剤として有用である。

【0065】

【実施例】

以下、実施例、参考例および実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1. 遅延型足せき反応抑制作用

フロイントの不完全アジュバントにミコバクテリウム・ブチリカム (*Mycobacterium butyricum*) の乾燥死菌を2.5 mg/ml となるように加えて乳剤とした後、C57BL/6 系雌性マウスにその0.2 mlを皮下注射して抗原感作を行った。14日後に生理的食塩水に懸濁した10 mg のミコバクテリウム・ブチリカム (*Mycobacterium butyricum*) の乾燥死菌を、右側フットパッド (foot pad) に皮下注射して反応を惹起した。24時間後に左右のフットパッド (foot pad) 重量を測定し、重量の差を反応の強さとした。

【0066】

MR16-1抗体は抗原感作と同時に1回のみ0.125 mg、0.5 mgあるいは2 mgを腹腔内投与した。コントロール群にはイソタイプが同じであるラットIgG (KH-5) を、また、感作しなかったマウス群には生理的食塩水を同様に投与した。その結果は図1に示す通りである。

抗原感作日に1回MR16-1を投与することにより、遅延型足せき浮腫反応は用量依存的に抑制された。

【0067】

参考例1. ヒト可溶性IL-6受容体の調製

Yamasakiらの方法 (Science (1988) 241, 825-828) に従い得られたIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpBSF2R.236を用いて、PCR法により可溶性

IL-6受容体を作成した。プラスミドpBSF2R.236を制限酵素Sph I で消化して、IL-6受容体cDNAを得、これをmp18 (Amersham製) に挿入した。IL-6受容体cDNAにストップコドンを導入するようにデザインした合成オリゴプライマーを用いて、インビトロミュータジェネシスシステム (Amersham製) により、PCR 法でIL-6受容体cDNAに変異を導入した。この操作によりストップコドンがアミノ酸345 の位置に導入され、可溶性IL-6受容体をコードするcDNAが得られた。

【0068】

可溶性IL-6受容体cDNAをCHO 細胞で発現するために、プラスミドpSV (Pharmacia 製) と連結させ、プラスミドpSVL344 を得た。dhfrのcDNAを含むプラスミドpECEdhfrにHind III-Sal Iで切断した可溶性IL-6受容体cDNAを挿入し、CHO 細胞発現プラスミドpECEdhfr344 を得た。

10 μ g のプラスミドpECEdhfr344 をdhfr-CHO細胞株DXB-11 (Urland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) ヘカルシウムフォスフェイ ト沈降法 (Chen et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751) により、トランスフェクトした。トランスフェクトしたCHO 細胞を1mM グルタミン、10% 透析FCS、100U/ml のペニシリンおよび100 μ /ml のストレプトマイシンを含むヌクレオシド不含 α MEM 選択培養液で3 週間培養した。

【0069】

選択されたCHO 細胞を限界希釈法でスクリーニングし、単一のCHO 細胞クローンを得た。このCHO 細胞クローンを20nM-200nMの濃度のメトトレキセート (MTX) で増幅し、ヒト可溶性IL-6受容体産生CHO 細胞株5E27を得た。CHO 細胞株5E27を5%FBS を含むイスコーブ改変ダルベコ培養液 (IMDM, Gibco 製) で培養した。培養上清を回収し、培養上清中の可溶性IL-6受容体の濃度をELISA にて測定した。

【0070】

参考例2. ヒト抗IL-6抗体の調製

10 μ g の組換え型IL-6 (Hiranoら、Immunol. Lett., 17:41, 1988) をフロイント完全アジュバントとともにBALB/cマウス免疫し、血清中に抗IL-6抗体が検出できるまで一週間毎にこれを続けた。局所のリンパ節から免疫細胞を摘出し、ポリ

エチレングリコール1500を用いてミエローマ細胞株P3U1と融合させた。ハイブリドーマをHAT 培養液を用いるOjらの方法 (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H.Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) に従って選択し、ヒトIL-6抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

【0071】

ヒト抗IL-6抗体を産生するハイブリドーマは下記のようにしてIL-6結合アッセイをおこなった。すなわち、柔軟なポリビニル製の96穴マイクロプレート (Dynatech Laboratories, Inc. 製, Alexandria, VA) を0.1Mのcarbonate-hydrogen carbonate緩衝液 (pH 9.6) 中で100 μ l のヤギ抗マウスIg (10 μ l/ml, Cooper Biomedical, Inc製 Malvern, PA) により4 $^{\circ}$ Cで一晩コートした。次いで、プレートを100 μ l の1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBS により室温で2 時間処理した。

【0072】

これをPBS で洗浄した後、100 μ l のハイブリドーマ培養上清を各穴へ加え、4 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートした。プレートを洗浄して、2000cpm/0.5ng/wellとなるように 125 I標識組換え型IL-6を各穴へ添加し、洗浄した後各穴の放射活性をガンマカウンター (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) で測定した。216 個のハイブリドーマクローンのうち32個のハイブリドーマクローンがIL-6結合アッセイにより陽性であった。これらのクローンのなかで最終的に安定なMH166.BSF2が得られた。該ハイブリドーマが産生する抗IL-6抗体MH166はIgG1 κ 型のサブタイプを有する。

【0073】

ついで、IL-6依存性マウスハイブリドーマクローンMH166.BSF2を用いてMH166によるハイブリドーマの増殖に関する中和活性を調べた。MH166.BSF2細胞を 1×10^4 /200 μ l/穴となるように分注し、これにMH166 抗体を含むサンプルを加え、48時間培養し、15.1Ci/mM の 3 Hチミジン (New England Nuclear, Boston, MA) を加えた後、更に6 時間培養を続けた。細胞をグラスフィルターペーパー上におき、自動ハーベスター (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan) で処理した。コントロールとしてウサギ抗IL-6抗体を用いた。

その結果、MH166 抗体はIL-6により誘導されるMH166.BSF2細胞の ^3H チミジンの取込みを容量依存的に阻害した。このことより、MH166 抗体はIL-6の活性を中和することが明らかとなった。

【0074】

参考例3. ヒト抗IL-6受容体抗体の調製

Hirataらの方法 (J. Immunol., 143:2900-2906, 1989) により作成した抗IL-6抗体MT18をCNBrにより活性化させたセファロース4B (Pharmacia Fine Chemicals 製, Piscataway, NJ) と添付の処方にしたがって結合させ、IL-6レセプター (Science (1988) 241, 825-828) を精製した。ヒトミエローマ細胞株U266を1%ジギトニン (Wako Chemicals製), 10mMトリエタノールアミン (pH 7.8) および0.15 M NaClを含む1mM p-パラアミノフェニルメタンスルフォニルフルオリドハイドロクロリド (Wako Chemicals製) (ジギトニン緩衝液) で可溶化し、セファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で6回洗浄し、免疫するための部分精製IL-6受容体とした。

【0075】

BALB/cマウスを 3×10^9 個のU266細胞から得た上記部分精製IL-6受容体で10日おきに4回免疫し、その後常法によりハイブリドーマを作成した。成長陽性穴からのハイブリドーマ培養上清を下記の方法にてIL-6受容体への結合活性を調べた。 5×10^7 個のU266細胞を ^{35}S -メチオニン (2.5mCi) で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可溶化した。可溶化したU266細胞を0.04ml容量のセファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で6回洗浄し、0.25mlのジギトニン緩衝液 (pH3.4) により ^{35}S -メチオニン標識IL-6受容体を流出させ、0.025mlの1M Tris (pH 7.4) で中和した。

【0076】

0.05mlのハイブリドーマ培養上清を0.01mlのProtein G セファロース (Pharmacia 製) と混合した。洗浄した後、セファロースを上記で調製した0.005mlの ^{35}S 標識IL-6受容体溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質をSDS-PAGEで分析し、IL-6受容体と反応するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローンPM-1を樹立した。ハイブリドーマPM-1から産生さ

れる抗体は、IgG1 κ 型のサブタイプを有する。

【0077】

ハイブリドーマPM-1が産生する抗体のヒトIL-6受容体に対するIL-6の結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株U266を用いて調べた。ヒト組換え型IL-6を大腸菌より調製し (Hiranoら, Immunol. Lett., 17:41, 1988)、ボルトン-ハンター試薬 (New England Nuclear, Boston, MA) により¹²⁵I 標識した (Taga, T et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967)。 4×10^5 個のU266細胞を100倍量の過剰な非標識IL-6の存在下で室温にて、1時間、70% (v/v) のハイブリドーマPM-1の

培養上清を14000cpmの¹²⁵I 標識IL-6とともに培養した。70 μ l のサンプルを400 μ l のマイクロフュージポリエチレンチューブに300 μ l のFCS上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。

その結果、ハイブリドーマPM-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

【0078】

参考例4. マウス抗IL-6受容体抗体の調製

Saito, et al., J. Immunol. (1993) 147, 168-173に記載の方法により、マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を調製した。

マウス可溶性IL-6受容体を産生するCHO細胞を10%FCSを含むIMDM培養液で培養し、その培養上清からマウス可溶性IL-6受容体RS12 (上記Saito, et al参照) と Affigel 10ゲル (Biorad) に固定したアフィニティーカラムを用いてマウス可溶性IL-6受容体を精製した。

【0079】

得られたマウス可溶性IL-6受容体50 μ g をフロイント完全アジュバンドと混合し、ウイスターラット (日本チャルズリバー) の腹部に注射した。2週間後からはフロイント不完全アジュバンドで追加免疫した。45日目にラットを屠殺し、その脾細胞約 2×10^8 個を 1×10^7 個のマウスミエローマ細胞P3U1と50%のPEG1500 (ベーリンガーマンハイム) をもちいて常法により細胞融合させた後、HAT 培地にてハイブリドーマをスクリーニングした。

【0080】

ウサギ抗ラットIgG 抗体（カップル）をコートしたプレートにハイブリドーマ培養上清を加えた後、マウス可溶性IL-6受容体を反応させた。次いで、ウサギ抗マウスIL-6受容体抗体およびアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギIgGによるELISA 方によりマウス可溶性IL-6受容体に対する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。抗体の産生が確認されたハイブリドーマクローンは2 回のサブスクリーニングを行い、単一のハイブリドーマクローンを得た。このクローンをMR16-1と名付けた。

【0081】

このハイブリドーマが産生する抗体のマウスIL-6の情報伝達における中和活性をMH60.BSF2 細胞 (Matsuda et al., J. immunol. (1988) 18, 951-956) を用いた³Hチミジンの取込みで調べた。96ウェルプレートにMH60.BSF2 細胞を 1×10^4 個/200 μ l/ウェルとなるように調製した。このプレートに10pg/ml のマウスIL-6とMR16-1抗体またはRS12抗体を12.3~1000ng/ml を加えて37℃、5% CO₂で44時間培養した後、1 μ Ci/ ウェルの³Hチミジンを加えた。4 時間後に³Hチミジンの取込みを測定した。その結果MR16-1抗体はMH60.BSF2 細胞の³Hチミジン取込みを抑制した。

したがって、ハイブリドーマMR16-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

【0082】

【発明の効果】

本発明により、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストが感作T細胞の抑制効果を有することが示された。したがって、IL-6アンタゴニストは多発性硬化症、ぶどう膜炎、慢性甲状腺炎、遅延性過敏症、接触性皮膚炎またはアトピー性皮膚炎の治療剤として有用であることが明らかにされた。

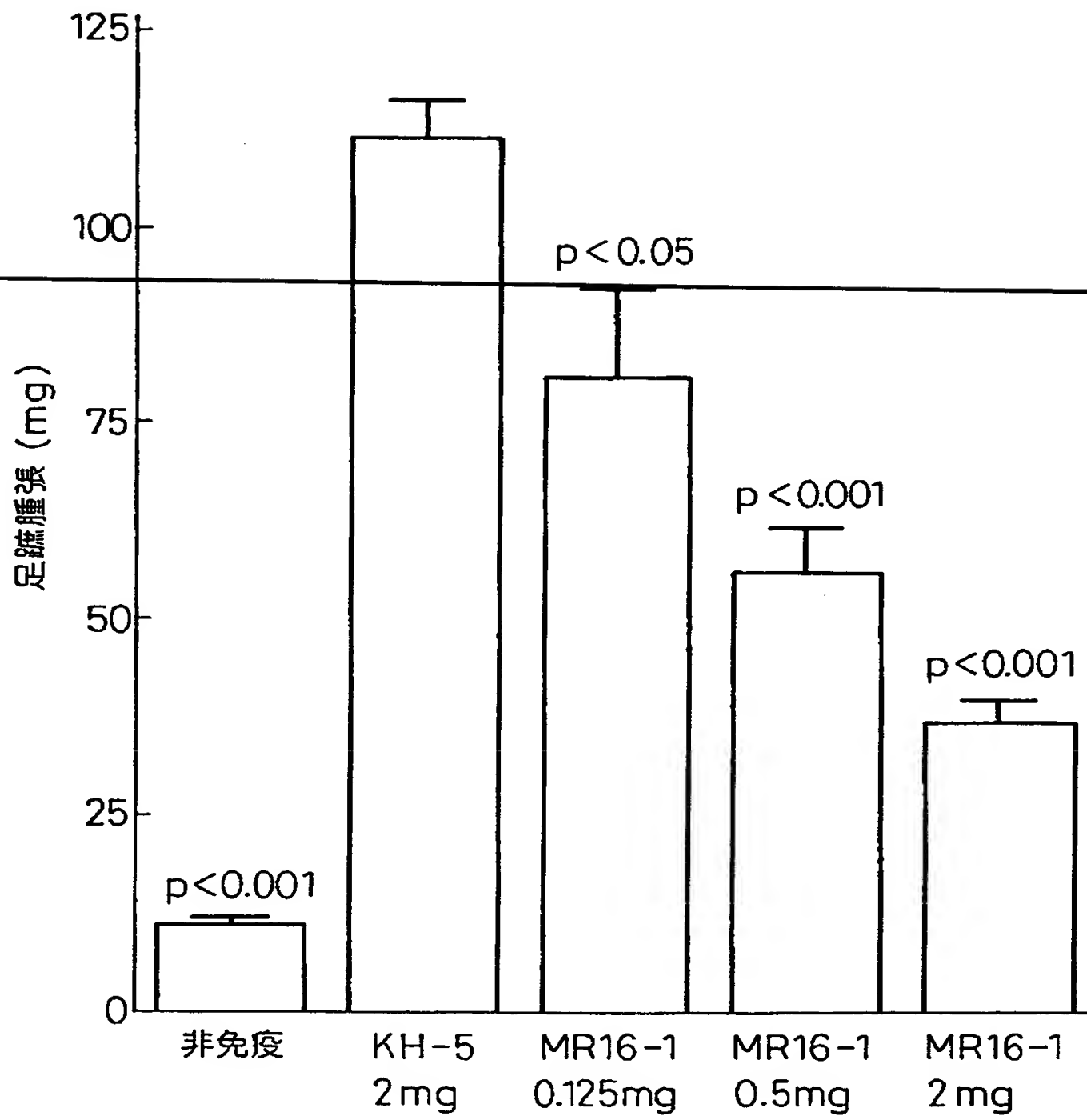
【図面の簡単な説明】

【図1】

図1 は、結核菌感作と同時にMR16-1を投与した際の、MR16-1のマウス遅延型足せき浮腫反応抑制作用を示す。

【書類名】 図面

【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 感作T細胞関与疾患の新規な予防・治療剤の提供。

【解決手段】 インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニスト、例えばIL-6受容体に対する抗体、IL-6に対する抗体、gp130に対する抗体等を含んで成る、感作T細胞関与疾患の予防または治療剤。

【選択図】 図1

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000003311

【住所又は居所】

東京都北区浮間5丁目5番1号

【氏名又は名称】

中外製薬株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100077517

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】

石田 敬

【選任した代理人】

【識別番号】

100087871

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】

福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】

100088269

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】

戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】

100082898

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】

西山 雅也